

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-133958

(43)Date of publication of application : 28.05.1993

(51)Int.Cl.

G01N 33/68

G01N 33/50

// G01N 27/62

(21)Application number : 03-300818

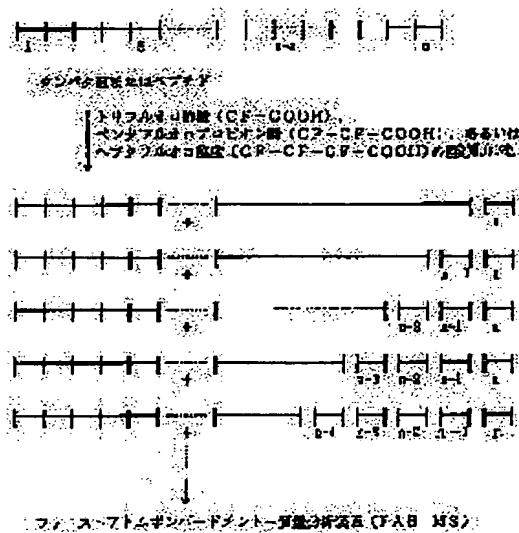
(71)Applicant : SEIKO INSTR INC

(22)Date of filing : 15.11.1991

(72)Inventor : TSUGITA AKIRA
TAKAMOTO KEIJI
SATAKE KAZUO
UCHIDA TOYOAKI**(54) METHOD OF DETERMINING AMINO ACID SEQUENCE FROM CARBOXYL TERMINAL OF PROTEIN OR PEPTIDE****(57)Abstract:**

PURPOSE: To determine an amino acid sequence from a carboxyl terminal of protein or peptide with a handy operation without using any enzyme.

CONSTITUTION: Protein or peptide is given acid anhydride of organic acid expressed by the formula of $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_n-\text{COOH}$ (n is integer of 0 or more), for example, the acid anhydride of trifluoroacetic acid ($n=0$), pentafluoropropionic acid ($n=0$) or heptafluorobutyric acid ($n=2$) to make the acid anhydride act thereon. The resulting reaction mixture is applied to a mass spectrograph to obtain a mass spectrum and the mass of chemical species contained in the reaction mixture is measured thereby determining an amino acid sequence from a carboxyl terminal of the protein or peptide.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 14.11.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2686506

[Date of registration] 22.08.1997

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

特開平5-133958

(43)公開日 平成5年(1993)5月28日

(51) Int.CI. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G01N 33/68		7055-2J		
33/50	P	7055-2J		
// G01N 27/62	ZNA	V 7363-2J		

審査請求 未請求 請求項の数6 (全19頁)

(21)出願番号 特願平3-300818

(22)出願日 平成3年(1991)11月15日

(71)出願人 000002325
セイコー電子工業株式会社
東京都江東区亀戸6丁目31番1号

(72)発明者 次田 眞
千葉県柏市泉町17-28 石塚ビル305

(72)発明者 高本 圭司
千葉県流山市西深井637-3 パナハイツルネサンス104

(72)発明者 佐竹 一夫
神奈川県川崎市多摩区三田4-8-2 7-303

(74)代理人 弁理士 林 敬之助

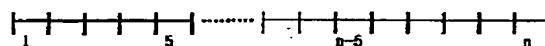
最終頁に続く

(54)【発明の名称】タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法

(57)【要約】

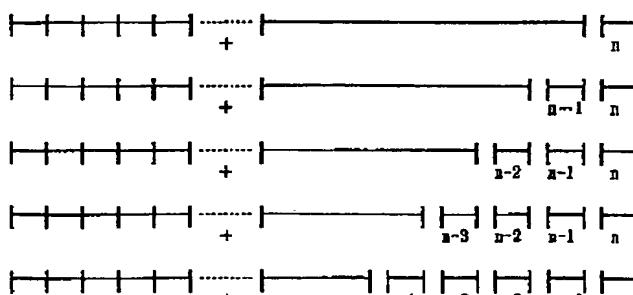
【目的】酵素を用いることなく、簡便な操作でタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する。

【構成】タンパク質あるいはペプチドに一般式、 $CF_3-(CF_2)_n-COOH$ (n は0以上の整数)で表される有機酸の、酸無水物、例えばトリフルオロ酢酸($n=0$)、ペンタフルオロプロピオン酸($n=1$)あるいはヘptaフルオロ酪酸($n=2$)の酸無水物を作用させ、その結果生じた反応混合物を質量分析装置にかけることにより質量スペクトルを得て、反応混合物に含まれる各化学種の質量を測定することにより、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する。



タンパク質またはペプチド

トリフルオロ酢酸(CF_3-COOH)、
ペンタフルオロプロピオン酸(CF_3-CF_2-COOH)、あるいは
ヘptaフルオロ酪酸($CF_3-CF_2-CF_2-COOH$)の酸無水物



ファーストアトムポンバードメント-質量分析装置 (FAB-MS)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質あるいはペプチドに、一般式、
 $C F_1 - (C F_1)_n - COOH$ (n は0以上の整数) で表される有機酸の、酸無水物を作用させることを特徴とした、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項2】 タンパク質あるいはペプチドに作用させる上記有機酸の酸無水物は、揮発性有機溶媒を用いた溶液として用いることを特徴とした、請求項1記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項3】 タンパク質あるいはペプチドに上記有機酸の酸無水物を作用させる温度は0°C以下であることを特徴とした、請求項1記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項4】 タンパク質あるいはペプチドに上記有機酸の酸無水物を作用させる時間は5時間以内であることを特徴とした、請求項1記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項5】 タンパク質あるいはペプチドに上記有機酸の酸無水物を作用させた反応混合物に水またはその蒸気を作用させることを特徴とした、請求項1記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項6】 上記タンパク質あるいはペプチドに上記有機酸の酸無水物を作用させた反応混合物に水またはその蒸気を作用させた反応生成物を、質量分析装置にかけることにより質量スペクトルを得ることを特徴とした、請求項1記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、タンパク質あるいはペプチドの1次構造解析法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端(C末端)からのアミノ酸配列を決定するためには、図2に示すようにタンパク質あるいはペプチドにカルボキシペプチダーゼを作用させ、酵素消化液を経時に1部ずつ採取し、その酵素消化液をアミノ酸分析装置で分析して、遊離されたアミノ酸を定量する方法が用いられてきた。(日本生化学会編、生化学実験講座第1巻、タンパク質の化学2、203-211ページ、1976年発行)

また、その酵素消化液を質量分析装置にかけて、C末端側のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドの質量を測定する方法も報告されている。(A. Tsugita, R.

van den Broek, M. Pyzybylski, FEBS. Lett. 137, 19 (1982))

さらに図3に示すように、C末端を無水酢酸で活性化し、トリメチルシリルイソチオシアネート(TMS-ITC)を結合させた後に、塩酸で切断する、という一連の操作を繰り返すことを利用した配列分析法も報告されている。(D. H. Hawke, H. W. Lamb, J. E. Shively, C. W. Todd, Anal. Biochem. 166, 298(1987))

【0003】

10 【発明が解決しようとする課題】 従来のカルボキシペプチダーゼを用いる方法は、酵素の基質特異性や活性がC末端アミノ酸あるいはそれに隣接するアミノ酸によってさまざまであること、そして他の酵素の混在があることから正確な分析が困難になることがあり、また酵素の自己消化性によってアミノ酸が遊離されるため高感度分析には適していなかった。

【0004】 また、TMS-ITCを用いる方法は3種類の試薬を繰り返し作用させる必要があるため操作が煩雑であるばかりでなく、繰り返し収率が悪いためいまだ実用化されるに至っていない。そこで本発明は、酵素あるいは他の複雑な有機化合物を用いることなく、簡便な操作でタンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定する方法を提供しようとするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明においては、上記の欠点を克服しC末端からのアミノ酸の配列分析を実行するために、タンパク質あるいはペプチドに、一般式、
 $C F_1 - (C F_1)_n - COOH$ (n は0以上の整数) で表される有機酸の、酸無水物、例えばトリフルオロ酢酸($n=0$)、ペンタフルオロプロピオン酸($n=1$)あるいはヘptaフルオロ酪酸($n=2$)の酸無水物を作成させた。

【0006】

【作用】 上記手段により、酵素あるいは他の複雑な有機化合物を用いることなく、簡便な操作でタンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することが可能になる。

【0007】

40 【実施例】 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明する。

(実施例1) ここでは実験方法の詳細を述べる。図1は本発明の分析方法を示す工程図である。タンパク質あるいはペプチドにトリフルオロ酢酸(TFA)、ペンタフルオロプロピオン酸(PFP)、あるいはヘptaフルオロ酪酸(HFBA)の酸無水物を作成させ、C末端からのペプチド鎖の逐次切断反応を生じさせる。さらに、この反応混合物に水を作成させた後、ファーストアトムポンバードメント質量分析装置(FAB-MS)にかけて質量スペクトルを得る。

【0008】本発明の分析手順は以下のとおりである。まずタンパク質あるいはペプチドを含む試料溶液1を小試験管2に入れた後乾燥させる。この試験管をあらかじめTFA、PFPア、あるいはHFBアの酸無水物のアセトニトリル溶液3（酸無水物の濃度は10%）を入れておいた試験管4に入れる。この際、試料1と有機酸の酸無水物3とは互いに接していない。次いで、この外側の試験管を零下30°Cの温度で、減圧しながら封管する。そしてこの試験管を零下18°Cに保つ（図4）。この後、封管をあけて減圧乾燥させる。乾燥された試料にビリジンを含む弱アルカリ性条件下で水の蒸気を作らせた後、ジメチルホルムアミドで溶解し、さらにグリセロールと混合した後、FAB-MSによって分析する。

【0009】ここで述べた最後の水処理操作は必ずしも必要としない。用いた質量分析の条件は以下のとおりである。

FAB-MS

装置本体：日本電子製 HX110型

イオン化法：FAB（ポジティブ）

イオン化ガス：キセノン

加速電圧：10kV

マトリックス：グリセロール

（実施例2）本発明を説明するために、ここでは配列番号1のオクタペプチド、Lys-Lys-Lys-His-Pro-Asp-Tyr-Ile、を試料ペプチドとして選び実験を行った。以下の説明においては、例えばLys-Lys-Lys-Hisはペプチド1-4、のように呼ぶこととする。

【0010】図6はTFA、図7はPFPアそして図8はHFBアの酸無水物をそれぞれ作用させた反応混合物をFAB-MSによって分析した結果を示したものである。この時、用いた酸無水物の濃度はそれぞれ10%であり、零下18°Cにおいて2時間作用させた。図5は比較のために、有機酸の酸無水物を作成していない配列番号1のペプチドそのものを分析した結果を示したものである。

【0011】TFAの酸無水物を作成した場合にC末端からの配列分析ができることが図6に示されている。それぞれTFAが付加した（アシル化された）ペプチド1-8（1-8+Acylと表記する）、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2が検出されており、C末端から6残基のアミノ酸配列が決定されることがわかる。また、-H₂O印で示したように、各ペプチドから水が1分子失われた生成物に由来するピークも観測されている。

【0012】図7からわかるように、PFPアの酸無水物を作成した場合にも、それぞれPFPアが付加したペプチド1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、およびアミノ末端のアミノ酸（1+Acylと表記する）が検出されており、C末端から全てのアミノ酸配列が決定されることがわかる。この際同時に、PFPアが2個付加したペ

プチド1-8（同様に1-8+diAcylと表記する）も検出されている。さらに、-H₂O印で示したように、前述の各ペプチドから水が1分子失われた生成物も検出されている。

【0013】HFBアの酸無水物を作成させた場合にも、同様にC末端からの配列分析ができることが図8に示されている。それぞれHFBアが付加したペプチド1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2およびアミノ末端のアミノ酸が検出されており、C末端から全てのアミノ酸配列が決定されることがわかる。この際も同時に、HFBアが2個付加したペプチド1-8も検出されている。また同様に、-H₂O印で示したように、前述の各ペプチドから水が1分子失われた生成物も検出されている。

【0014】そして、上記のいずれの場合においてもペプチド鎖内部のペプチド結合の開裂によって生成するペプチドは検出されていない。そのため、配列分析のためのデータの解析が容易である。このように、タンパク質あるいはペプチドに、一般式、CF_n- (CF₂)_n-COOH (nは0以上の整数)で表わされる有機酸の、酸無水物を作成した反応生成物を質量分析装置にかけることにより質量スペクトルを得て、各生成物の質量を測定することによって、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定出来ることがわかった。

【0015】（実施例3）次に、有機酸の酸無水物を作成させた際の反応温度の配列分析に及ぼす影響を調べた。ここでは、配列番号2のドデカペプチドAla-Arg-Gly-Ile-Lys-Gly-Ile-Arg-Gly-Phe-Ser-Glyを用い、PFPアの酸無水物を作成させた。それぞれ、図10は零下18°C、図11は0°Cで、それぞれ2時間PFPアの酸無水物を作成させた反応混合物を質量分析装置にかけた結果である。

【0016】図9は比較のために有機酸の酸無水物を作成していない配列番号2のペプチドそのものを分析した結果を示したものである。図10、および図11において、各反応条件下でそれぞれPFPアが付加したペプチド1-12、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2が検出されており、これらの条件下でC末端から10残基のアミノ酸配列が決定されることがわかる。この際同時に、それぞれPFPアが2個付加したペプチド1-12も検出されている。

【0017】また、図11に示されるように、0°Cで2時間PFPアの酸無水物を作成させた場合には、PFPアが2個付加したペプチド1-11、も検出されている。さらにこの場合、同定されていないピークがより多く検出されている。この結果から、より低温で処理した場合に副反応生成物に由来するシグナルの数が少なく、かつ主反応生成物由来のシグナルの相対強度が高いことがわかる。

【0018】（実施例4）図14乃至図17は、有機酸

5
の酸無水物を作用させる反応時間の、アミノ酸配列分析に及ぼす影響を調べた結果である。ここでは、配列番号3のアミノ酸23残基から成るペプチドを用い、PFP Aの酸無水物を零下18°Cにおいて、それぞれ10分間(図14)、30分間(図15)、1時間(図16)、そして5時間(図17)作用させた。

【0019】図13は比較のために有機酸の酸無水物を作用させていない配列番号3のペプチドそのものを分析した結果を示したものである。10分間作用させた場合(図14)には、配列分析に必要な1連のペプチドの生成を示すシグナルの強度は低かったが、ペプチド1-22, 1-21, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8が検出された。またP F P Aによるアシル化は、ペプチド1-22, 1-21に起きていることが認められた。

【0020】30分間作用させた場合(図15)には、ペプチド1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4が検出された。この場合には、P F P Aによるアシル化は完全ではない。また、1時間(図16)および5時間(図17)作用させた場合には、それぞれP F P Aが付加したペプチド1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4が十分検出されている。そして、これら2つの条件下では得られた各シグナルの強度はほぼ同じである。

【0021】のことから、有機酸の酸無水物を作用させる時間は5時間以内でよいことがわかる。

(実施例5) 図12は、配列番号2のドデカペプチドに零下18°Cで2時間P F P Aの酸無水物を作用させた後乾燥させた反応混合物に、さらにビリジンを含む弱アルカリ性条件下で水を作用させた後、分析した結果を示したものである。

【0022】図11との比較からわかるように、それぞれP F P Aが付加したペプチド1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2から水が1分子失われた一連のペプチドの検出強度が低くなっていることから、この条件によればより容易に配列分析が解析可能であることがわかる。以上述べてきた結果をまとめると次のようになる。

【0023】乾燥されたペプチドに、一般式、 $C_F_1 - (C_F_2)_n - COOH$ (n は0以上の整数)で表される有機酸の、酸無水物を作用させ、その反応混合物をF A B - M Sにかけることにより、試料としたペプチド及びそのペプチドのC末端のアミノ酸が逐次分解反応によって切断された一連のペプチドの質量スペクトルを得ることができる。これを解析することによって、試料としたペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定すること

ができる。

【0024】有機酸の酸無水物を作用させる反応時間は5時間以内で十分ある。反応温度を0°C以下とすることによって、副反応の進行を低く抑えることができる。また、有機酸の酸無水物を作用させた後、反応生成物に水を作用させることにより、脱水ピークを低く抑えることができ、解析が容易になる。またこの方法の特徴は、ペプチド鎖内部のペプチド結合の開裂によって生成するペプチドが検出されないため、配列分析のためのデータの解析が容易なことである。

【0025】

【発明の効果】本発明の重要な点は、タンパク質あるいはペプチドに、一般式、 $C_F_1 - (C_F_2)_n - COOH$ (n は0以上の整数)で表される有機酸の、酸無水物、例えばトリフルオロ酢酸($n=0$)、ペンタフルオロブロピオン酸($n=1$)あるいはヘptaフルオロ酪酸($n=2$)の酸無水物を作用させることにより、酵素あるいは他の複雑な有機化合物を用いることなく簡単な操作でタンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することが可能になったことである。

【0026】よって、本発明によるタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法はその工業的価値が大である。

(配列表)

配列番号：1

配列の長さ：8

配列の形：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Lys Lys His Pro Asp Tyr Ile

1 5

配列番号：2

配列の長さ：12

配列の形：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Arg Gly Ile Lys Gly Ile Arg Gly Phe Ser Gly

1 5 10

配列番号：3

配列の長さ：23

配列の形：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

7
配列

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Gly Lys Phe Gly Lys Ala
 1 5 10 15
 Phe Val Gly Glu Ile Met Lys Ser
 20

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の分析方法を示す工程図である。

【図 2】カルボキシペプチダーゼを用いた場合の従来の分析方法を示す工程図である。

【図 3】トリメチルシリルイソチオシアナートを用いた場合の従来の分析方法である。

【図 4】本発明の分析に用いる試料の封管状態を示す模式図である。

【図 5】酸無水物を作用させていない配列番号 1 のペプチドそのものを分析した結果を示す図である。

【図 6】P F P A の酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図 7】H F B A の酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図 8】T F A の酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図 9】酸無水物を作用させていない配列番号 2 のペプチドそのものを分析した結果を示す図である。

【図 10】零下 18 ° C で 2 時間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図 11】0 ° C で 2 時間酸無水物を作用させた反応混

合物を分析した結果を示す図である。

【図 12】零下 18 ° C で 2 時間酸無水物を作用させた後乾燥させた反応混合物にさらにピリジンを含む弱アルカリ性条件下で水を作用させた後、分析した結果を示す図である。

【図 13】酸無水物を作用させていない配列番号 3 のペプチドそのものを分析した結果を示す図である。

【図 14】零下 18 ° C で 10 分間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図 15】零下 18 ° C で 30 分間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

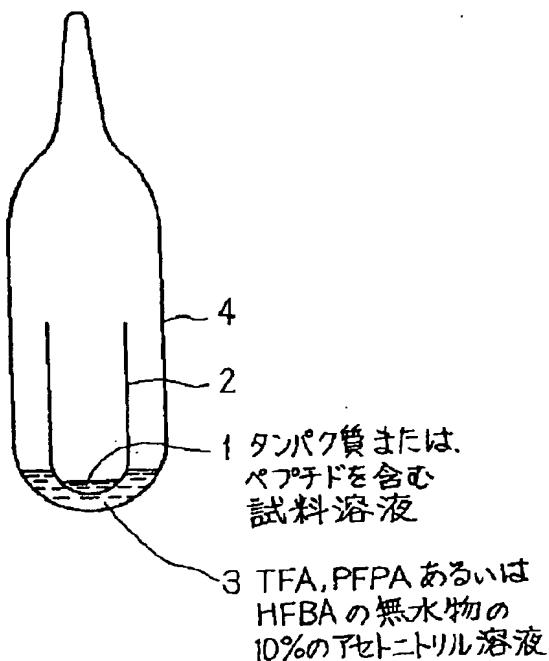
【図 16】零下 18 ° C で 1 時間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図 17】零下 18 ° C で 5 時間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

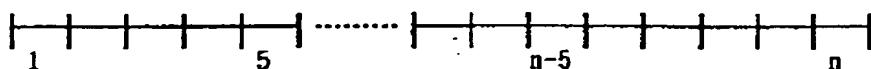
【符号の説明】

- 1 試料溶液
- 2 小試験管
- 3 有機酸の酸無水物の溶液
- 4 試験管

【図 4】

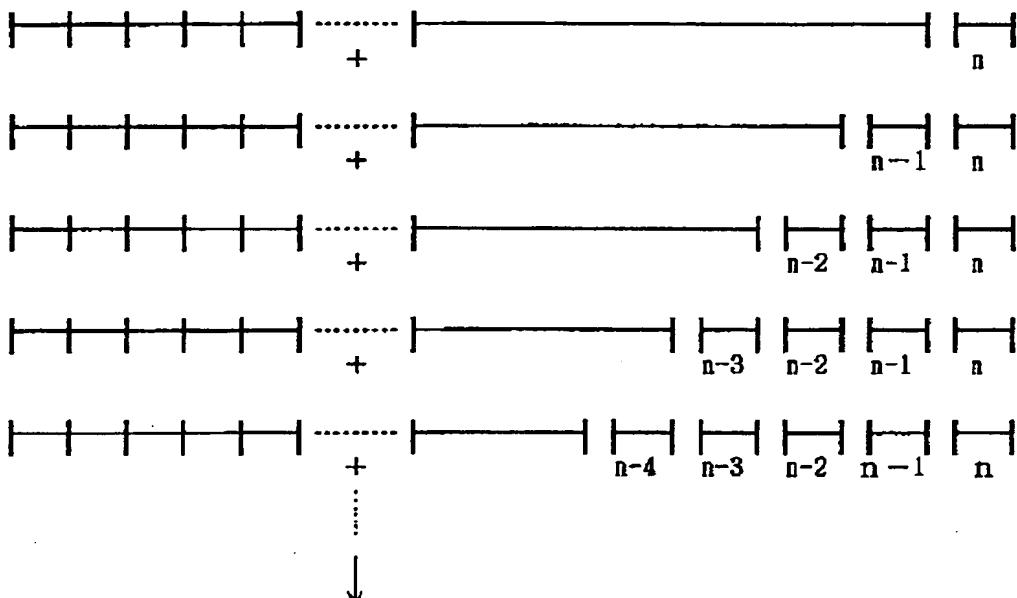


【図 1】



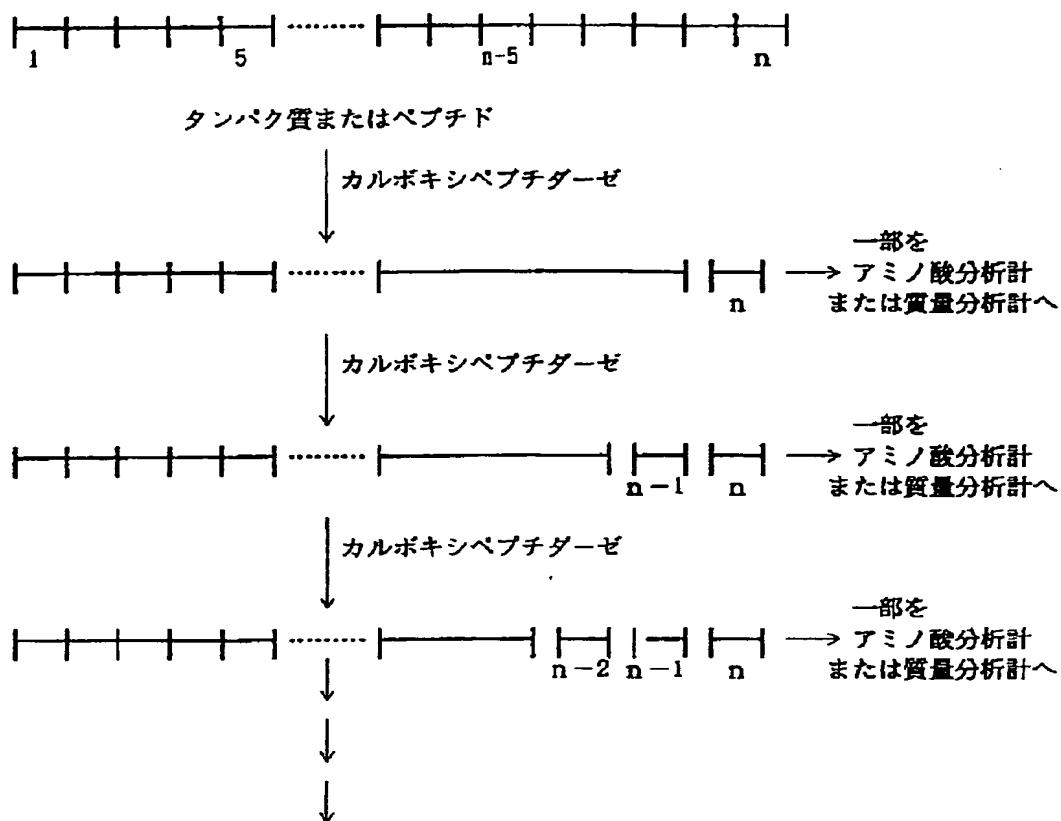
タンパク質またはペプチド

トリフルオロ酢酸 (CF_3COOH) ,
ペンタフルオロプロピオン酸 ($\text{CF}_3\text{C}(\text{F})_2\text{COOH}$) , あるいは
ヘプタフルオロ酪酸 ($\text{CF}_3\text{C}(\text{F})_2\text{C}(\text{F})_2\text{COOH}$) の酸無水物

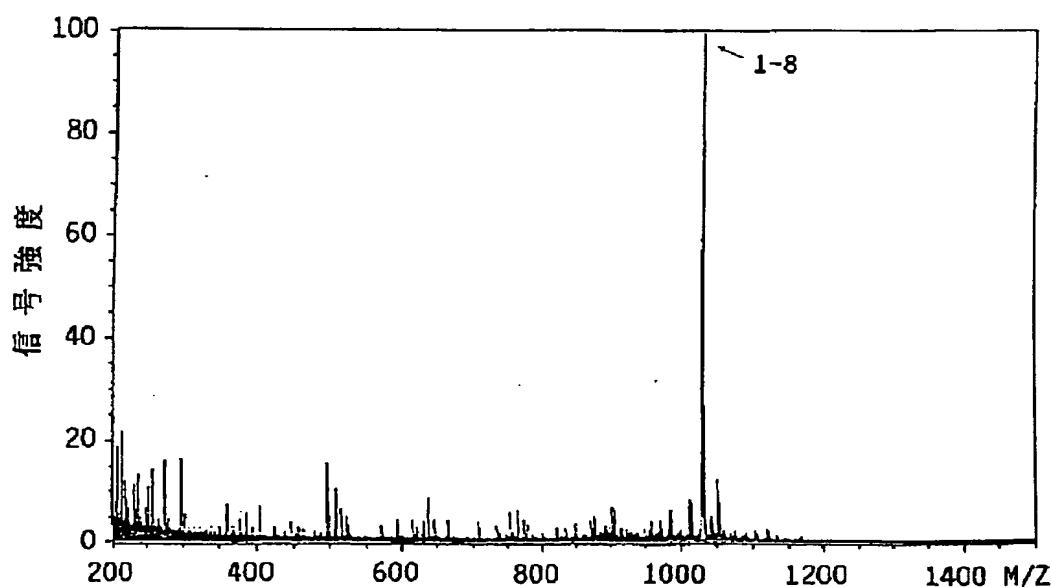


ファーストアトムボンバードメントー質量分析装置 (FAB-MS)

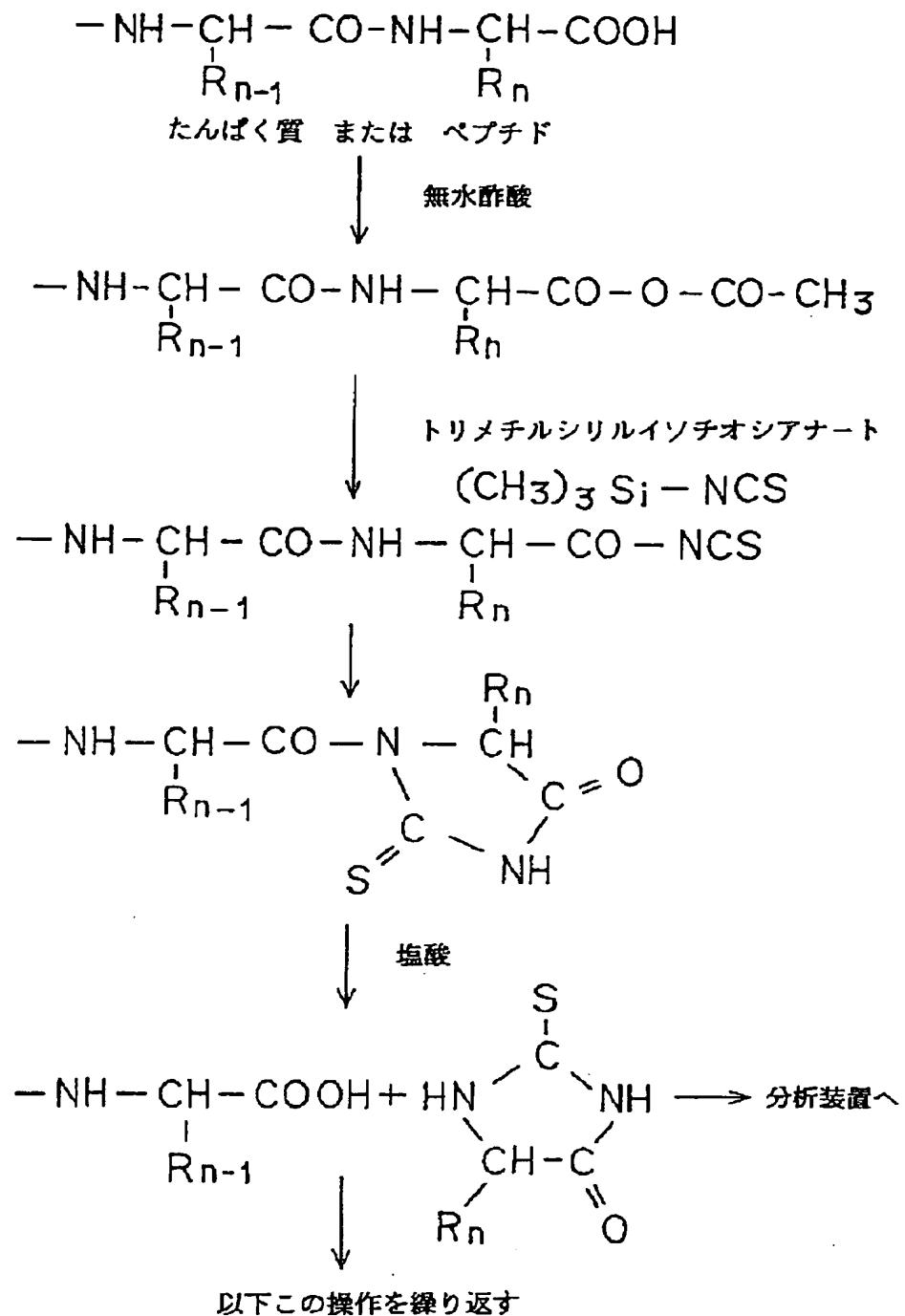
【図 2】



【図 5】

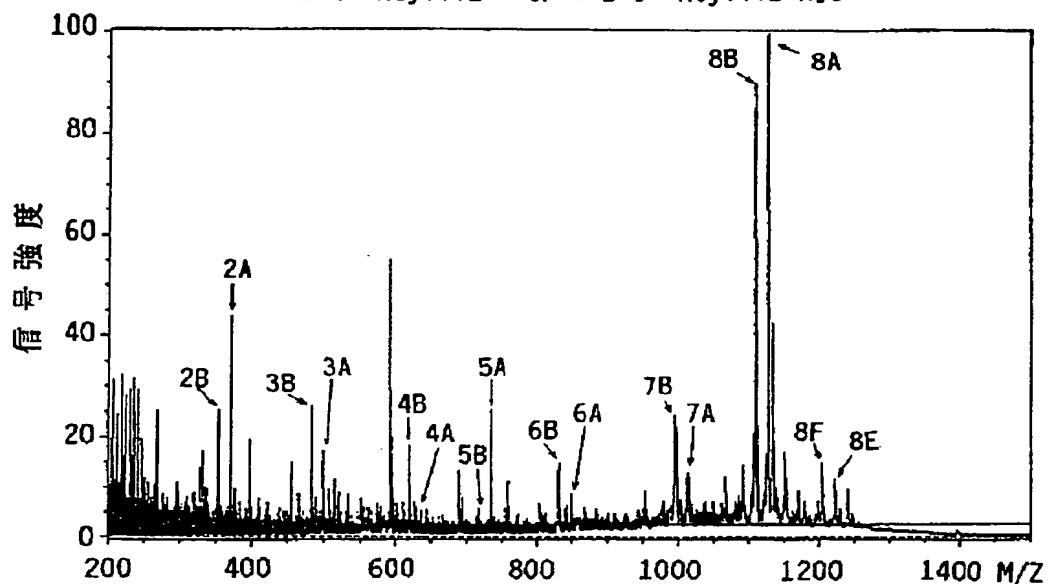


【図3】



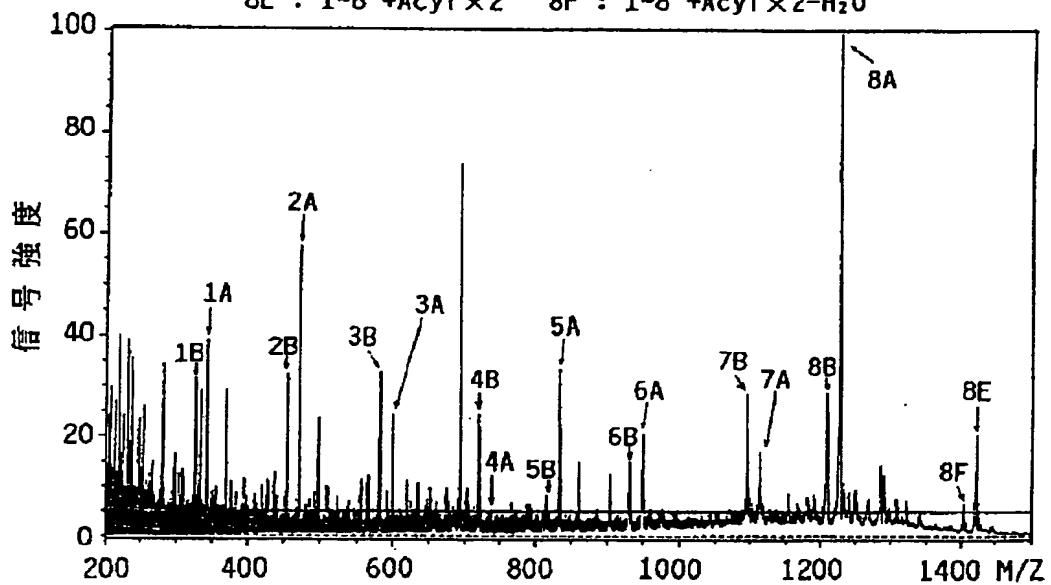
【図 6】

2A : 1-2 +Acy]	2B : 1-2 +Acy-H ₂ O
3A : 1-3 +Acy]	3B : 1-3 +Acy-H ₂ O
4A : 1-4 +Acy]	4B : 1-4 +Acy-H ₂ O
5A : 1-5 +Acy]	5B : 1-5 +Acy-H ₂ O
6A : 1-6 +Acy]	6B : 1-6 +Acy-H ₂ O
7A : 1-7 +Acy]	7B : 1-7 +Acy-H ₂ O
8A : 1-8 +Acy]	8B : 1-8 +Acy-H ₂ O
8E : 1-8 +Acy] × 2	8F : 1-8 +Acy] × 2-H ₂ O

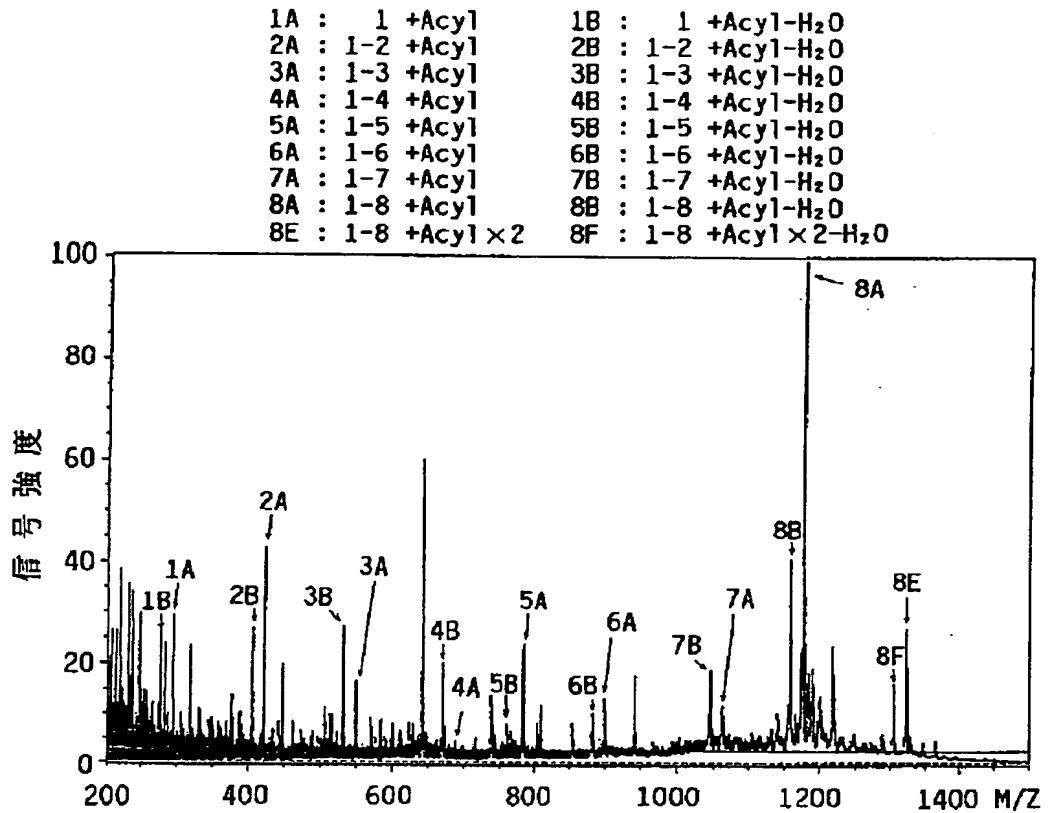


【図 7】

1A : 1 +Acyl	1B : 1 +Acyl-H ₂ O
2A : 1-2 +Acyl	2B : 1-2 +Acyl-H ₂ O
3A : 1-3 +Acyl	3B : 1-3 +Acyl-H ₂ O
4A : 1-4 +Acyl	4B : 1-4 +Acyl-H ₂ O
5A : 1-5 +Acyl	5B : 1-5 +Acyl-H ₂ O
6A : 1-6 +Acyl	6B : 1-6 +Acyl-H ₂ O
7A : 1-7 +Acyl	7B : 1-7 +Acyl-H ₂ O
8A : 1-8 +Acyl	8B : 1-8 +Acyl-H ₂ O
8E : 1-8 +Acyl × 2	8F : 1-8 +Acyl × 2-H ₂ O

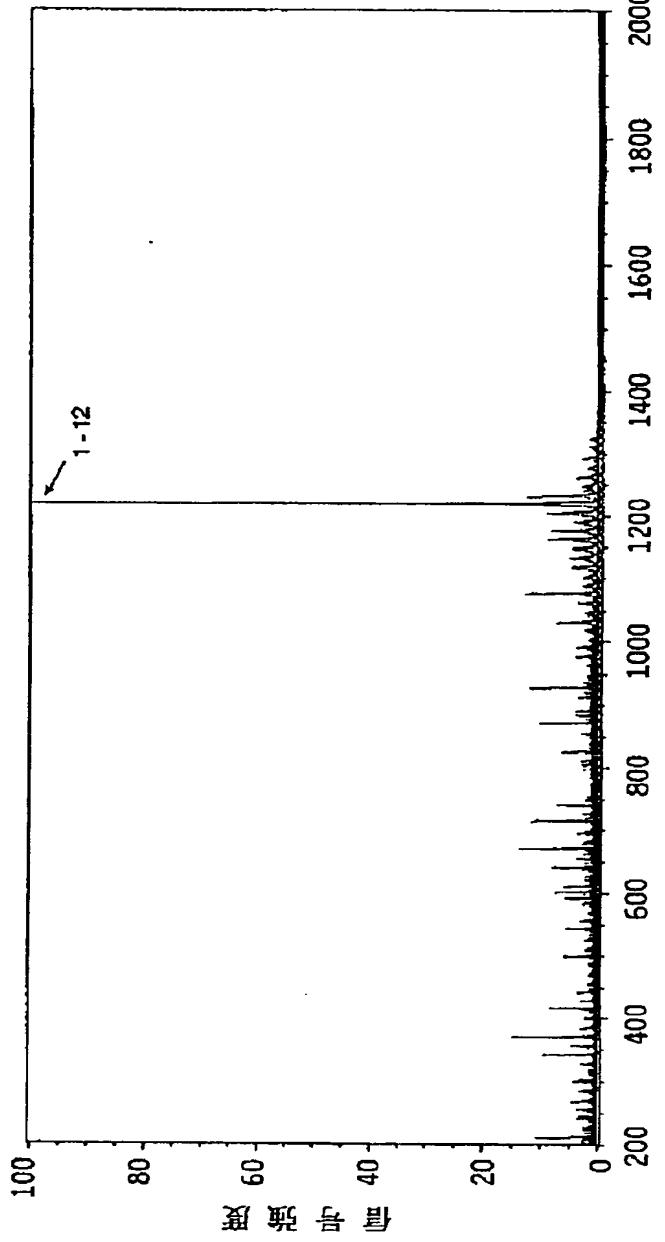


【図 8】

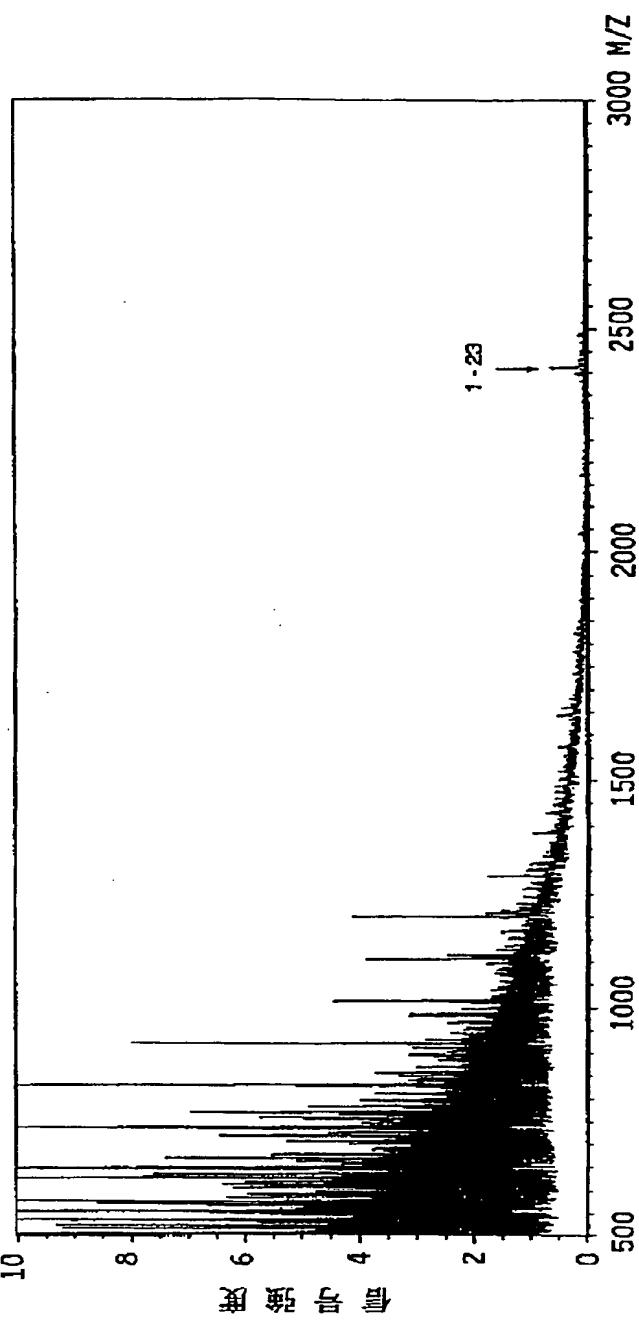


Best Available Copy

【図 9】



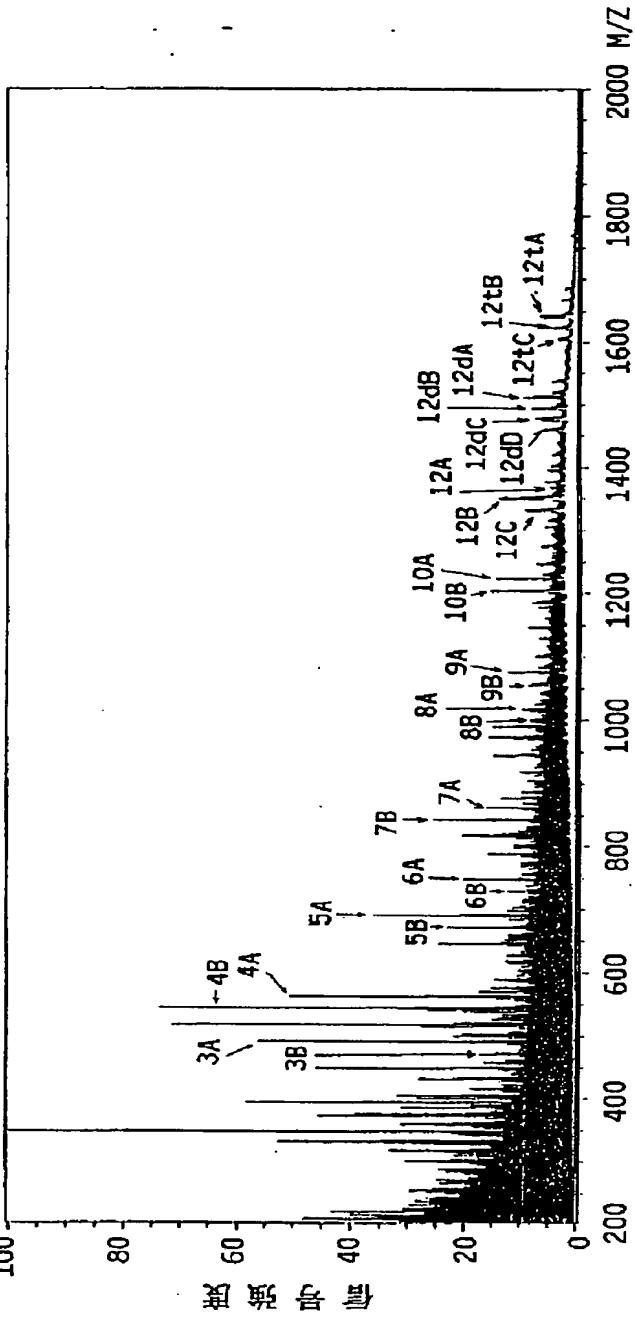
【図 13】



Rest Available Copy

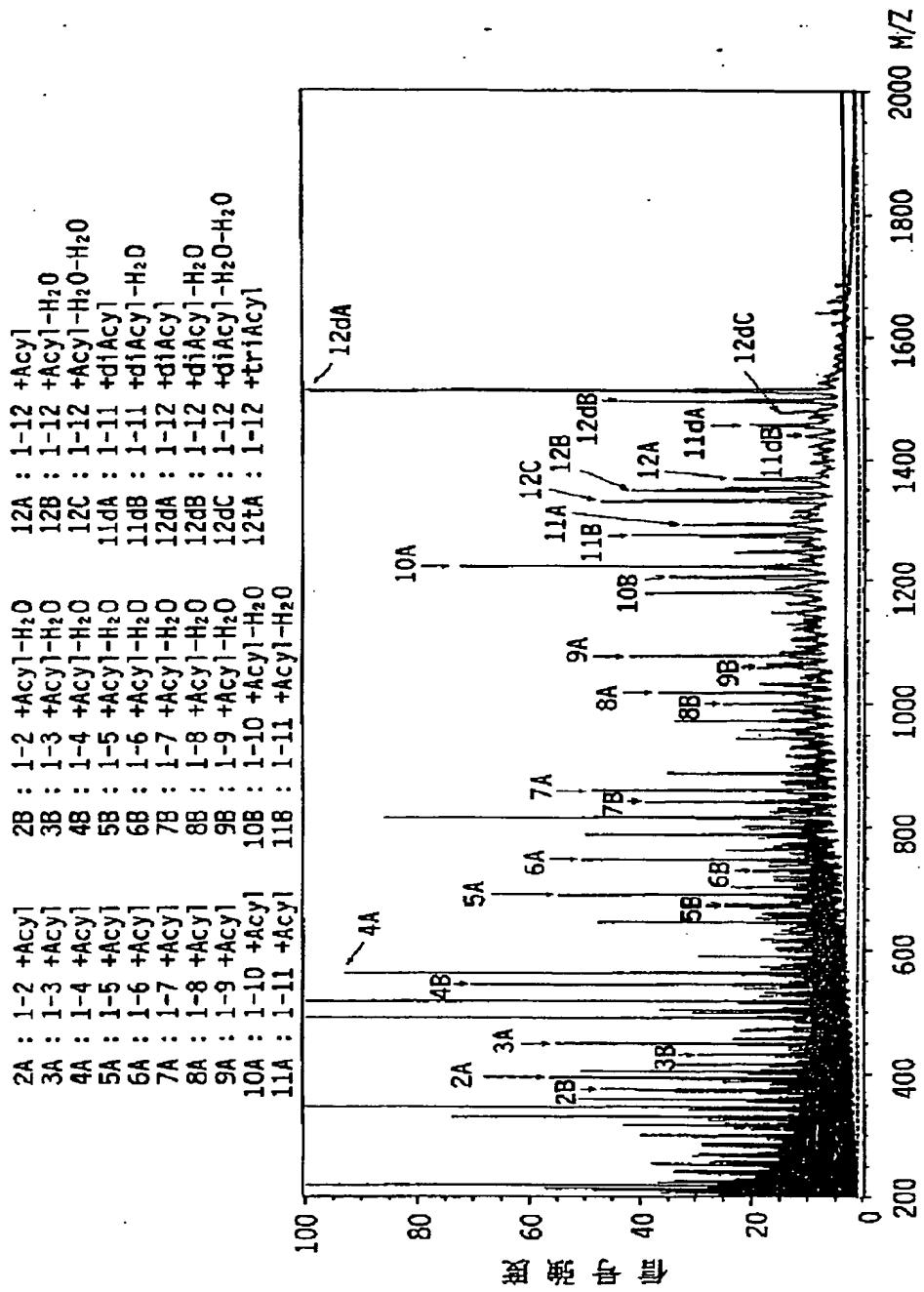
【図 10】

3A : 1-3 +Acy]	3B : 1-3 +Acy]-H ₂ O	12C : 1-12 +Acy]-H ₂ O-H ₂ O
4A : 1-4 +Acy]	4B : 1-4 +Acy]-H ₂ O	12dA : 1-12 +diAcy]
5A : 1-5 +Acy]	5B : 1-5 +Acy]-H ₂ O	12dB : 1-12 +diAcy]-H ₂ O
6A : 1-6 +Acy]	6B : 1-6 +Acy]-H ₂ O	12dC : 1-12 +diAcy1-H ₂ O-H ₂ O
7A : 1-7 +Acy]	7B : 1-7 +Acy]-H ₂ O	12dD : 1-12 +diAcy1-H ₂ O-H ₂ O-H ₂ O
8A : 1-8 +Acy]	8B : 1-8 +Acy]-H ₂ O	12tA : 1-12 +triAcy]
9A : 1-9 +Acy]	9B : 1-9 +Acy]-H ₂ O	12tB : 1-12 +triAcy]-H ₂ O
10A : 1-10 +Acy]	10B : 1-10 +Acy]-H ₂ O	12tC : 1-12 +triAcy]-H ₂ O-H ₂ O
12A : 1-12 +Acy]	12B : 1-12 +Acy]-H ₂ O	



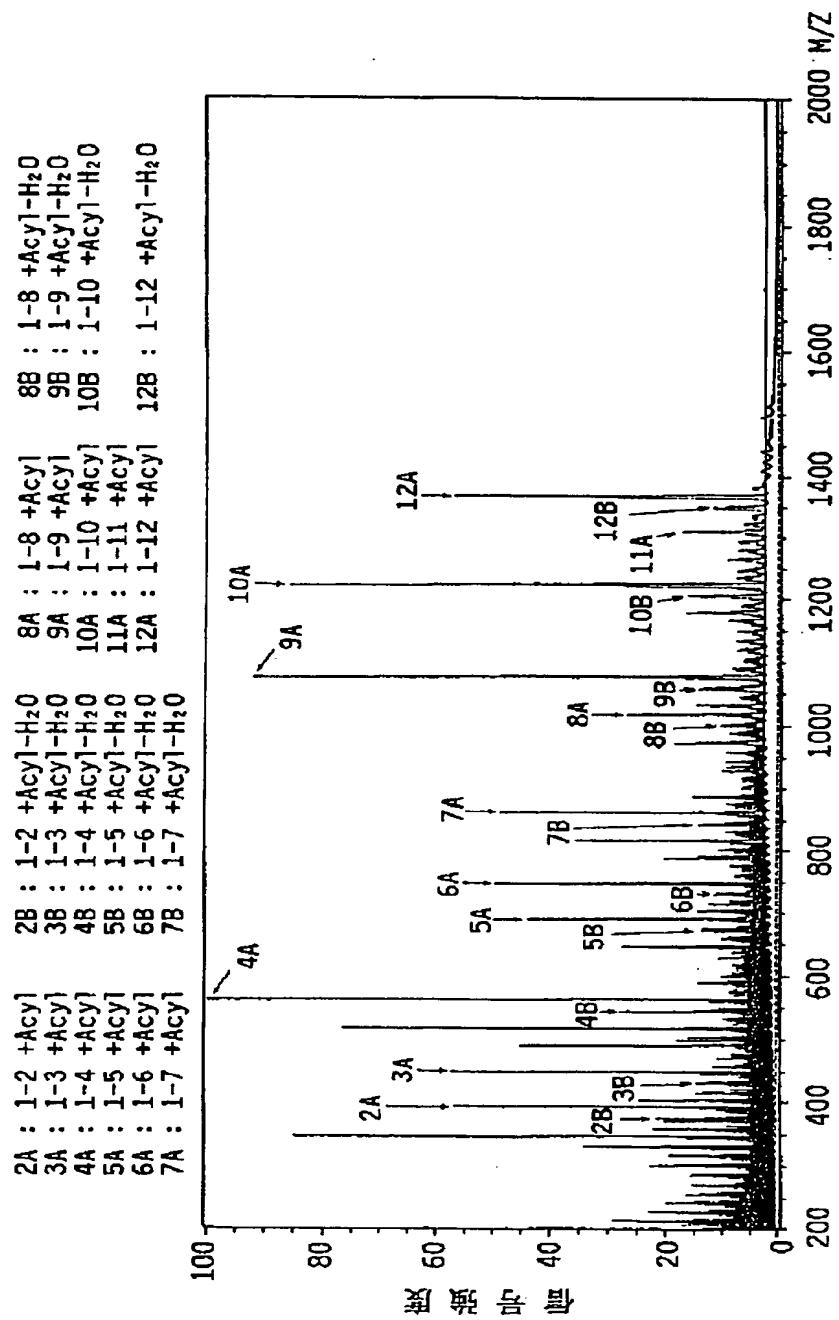
Rest Available Copy

【図 11】



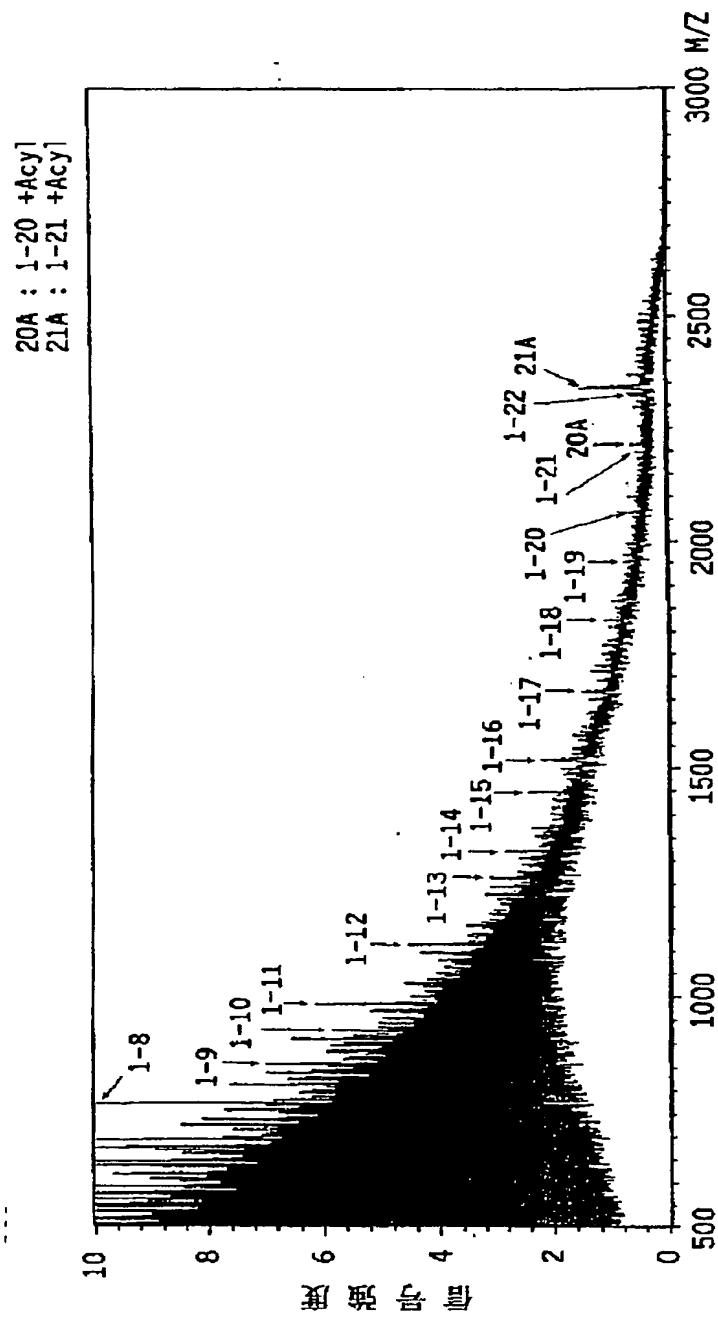
Best Available Copy

【図 1 2】



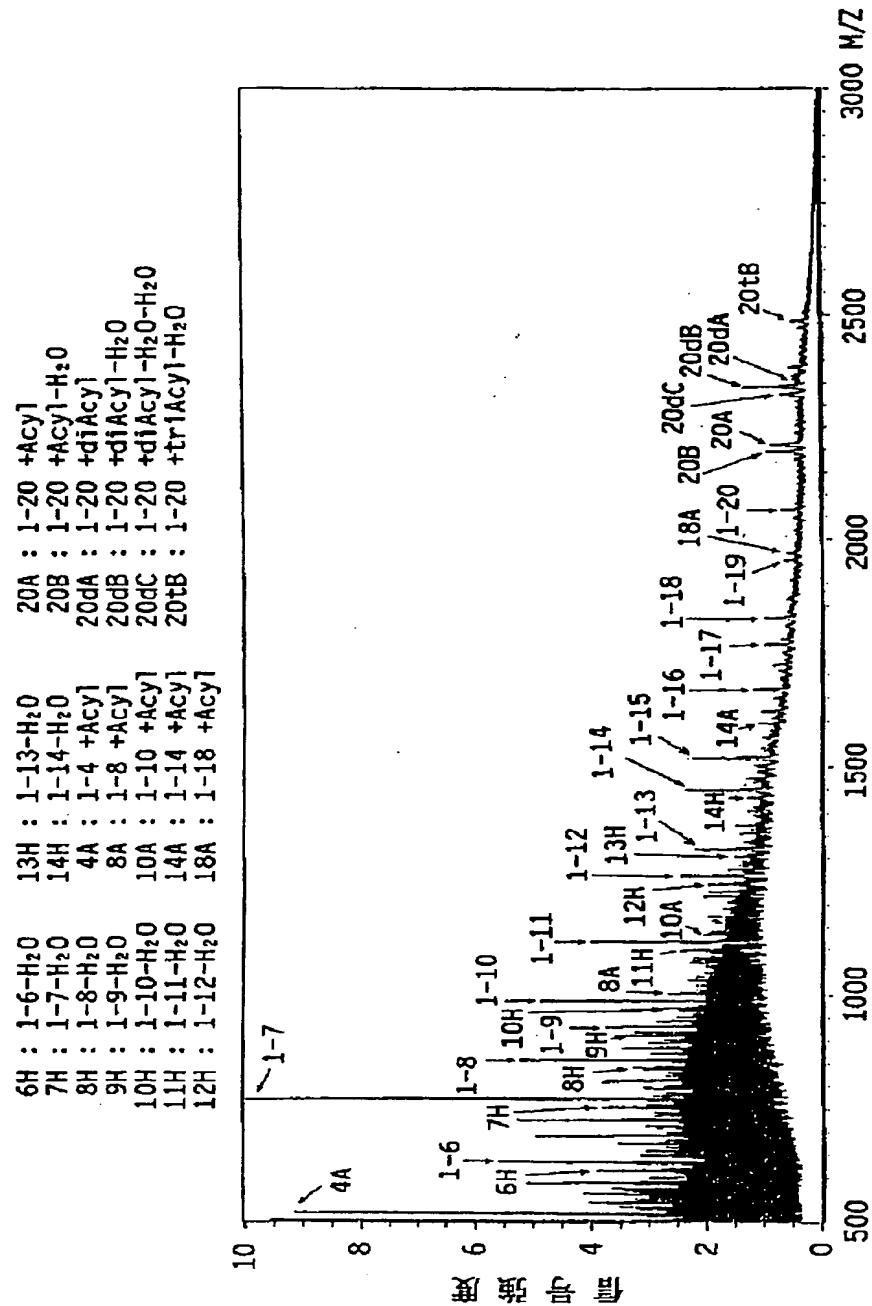
Best Available Copy

【図 14】



Best Available Copy

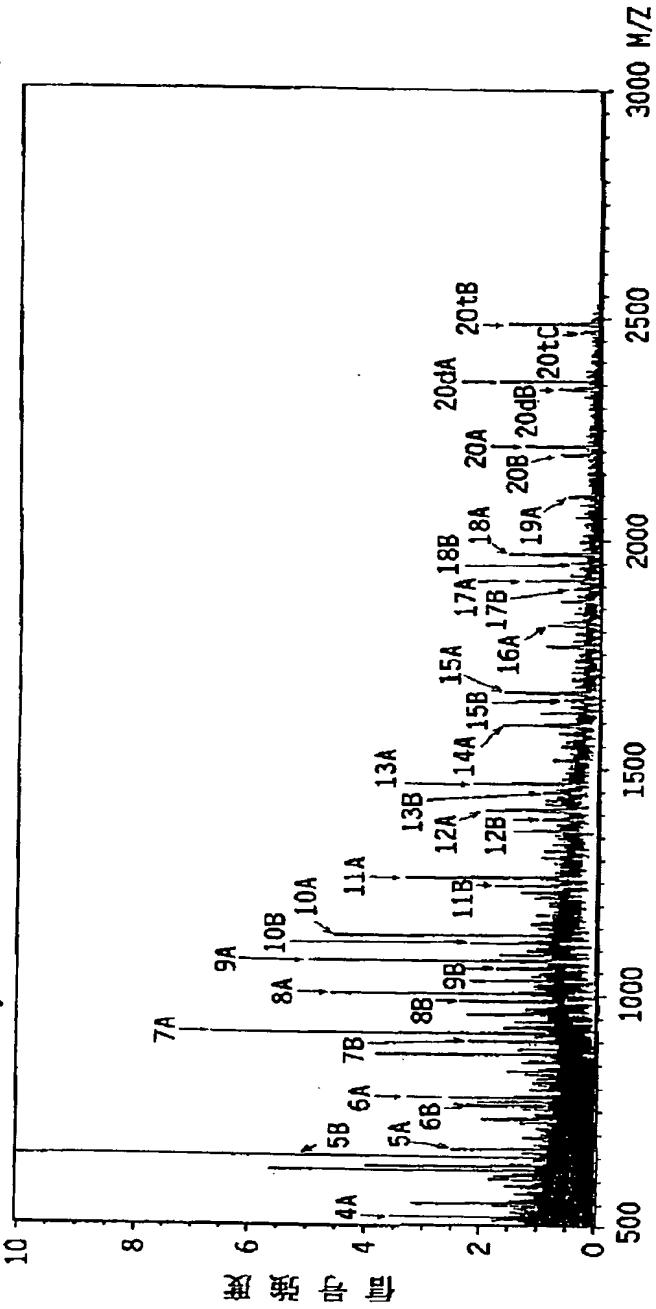
【図 15】



Rest Available Copy

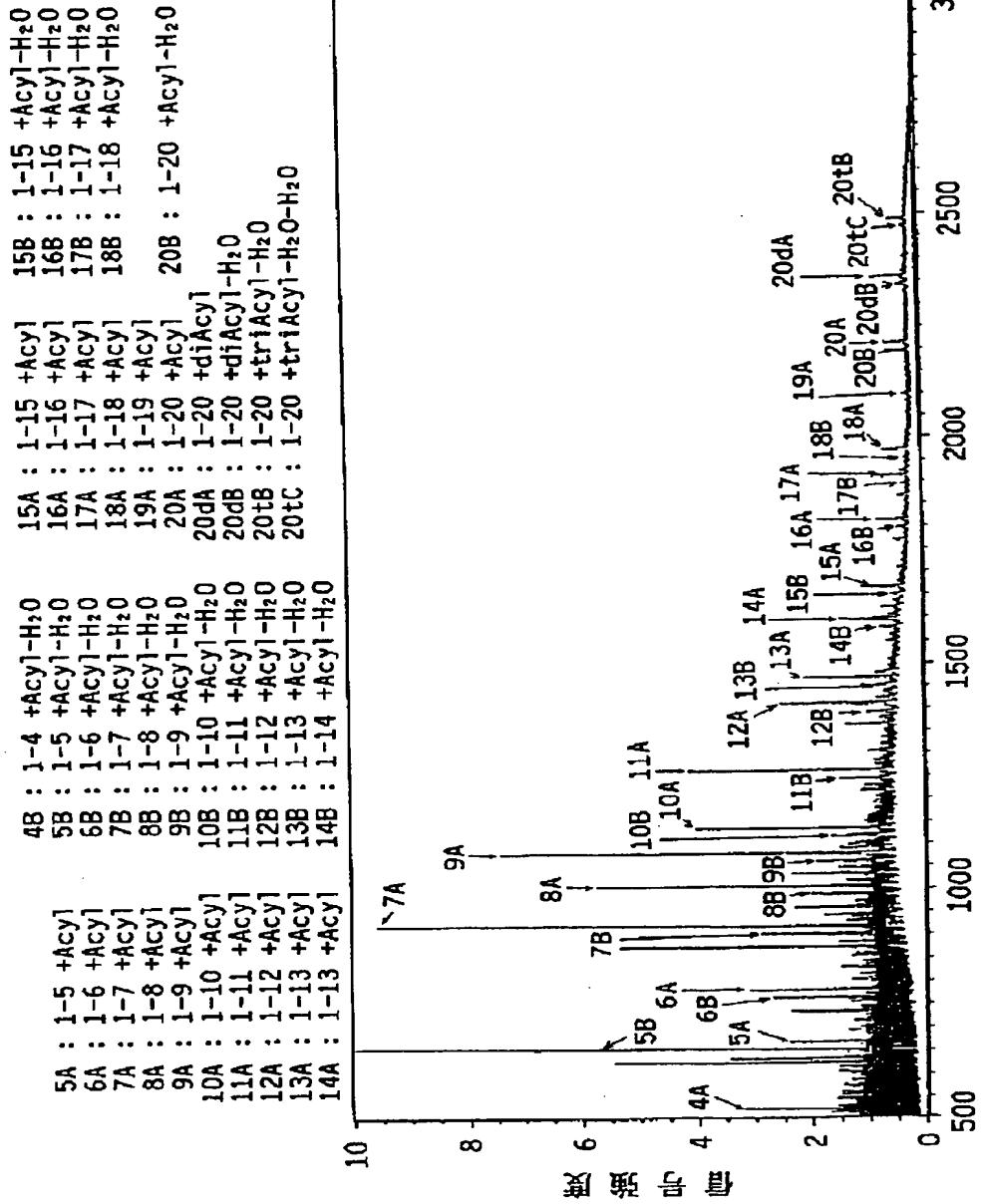
【図 16】

4A :	1-4 +Acy]
5A :	1-5 +Acy]
6A :	1-6 +Acy]
7A :	1-7 +Acy]
8A :	1-8 +Acy]
9A :	1-9 +Acy]
10A :	1-10 +Acy]
11A :	1-11 +Acy]
12A :	1-12 +Acy]
13A :	1-13 +Acy]
14A :	1-13 +Acy]
5B :	1-5 +Acy]-H ₂ O
6B :	1-6 +Acy]-H ₂ O
7B :	1-7 +Acy]-H ₂ O
8B :	1-8 +Acy]-H ₂ O
9B :	1-9 +Acy]-H ₂ O
10B :	1-10 +Acy]-H ₂ O
11B :	1-11 +Acy]-H ₂ O
12B :	1-12 +Acy]-H ₂ O
13B :	1-13 +Acy]-H ₂ O
15A :	1-15 +Acy]
16A :	1-16 +Acy]
17A :	1-17 +Acy]
18A :	1-18 +Acy]
19A :	1-19 +Acy]
20A :	1-20 +Acy]
20dA :	1-20 +diAcy]
20dB :	1-20 +diAcy]-H ₂ O
20tB :	1-2B +triAcy]-H ₂ O
20tC :	1-2B +triAcy]-H ₂ O



Rest Available Copy

【図 17】



フロントページの続き

(72)発明者 内田 豊明

東京都江東区亀戸 6 丁目 31 番 1 号 セイ

コー電子工業株式会社内

Best Available Copy